

AllType+S5/Chef 簡易プロトコル

注：この説明書は、英文添付文書の簡易訳です。製品に添付されている英文マニュアルも必ずご確認ください。
(Revision 1, 2018)

内容:

商品コード	商品名	梱包単位	保存温度
OLI-ALL-11XL	AllType NGS 11-Loci Amplification Kit	96 tests	冷凍 (-20℃)

必要な試薬:

- 英語マニュアルを参照ください

1. 準備:

- 英語マニュアルを参照ください

2. 操作方法:

■ Sample Amplification

- 1 次の試薬類を規定の温度に戻しておく

室温：DNA, AllType Buffer, AllType dNTPs, AllType Primer Mix

※AllType Buffer が濁っている場合は、37℃に温めて透明にする。

氷上：AllType Polymerase (ボルテックス禁止)。

- 2 以下のように 96 well PCR plate に試薬類を分注する

<u>Class I・Class II</u>	1 sample	x ()	
g DNA (25 ng/μL)	2.0 μL	-----	
AllType Buffer	4.0 μL		μL
AllType dNTPs	1.6 μL		μL
AllType Primer Mix	5.0 μL		μL
AllType Polymerase	0.8 μL		μL
Nuclease-Free Water	6.6 μL		μL
Total	20.0 μL	18 μL ずつ分注	

3. 軽くスピンドウンし、以下のプログラムでサーマルサイクラーにセットする

AllType 11-Loci		
94 °C	2 min	1 cycle
98 °C	10 sec	22 cycles
69 °C	3 min	
98 °C	10 sec	8 cycles
60 °C	3 min	
4 °C	∞	1 cycle

※モードは、9600 モード

<<Stop Point -30 ~ -10 °Cで1ヶ月保存可、-80 °Cで6ヶ月保存可>>

■ Purify the amplicons

1. AMPure XP Beads は、30 分以上室温に置いておく
2. 75%エタノールを必要な分量のみ作成する。

	1 sample	x ()
100 % EtOH	150 μL	μL
Nuclease-Free Water	50 μL	μL
<hr/>		
Total	200 μL	

3. 以下の様に Nunc 96 well plate に分注し、ピペッティングで混合する

AMPure XP Beads	12 μL
Amplified product	20 μL
<hr/>	
Total	32 μL

4. 室温 5 分静置→マグネットスタンドにセットし、3 分静置
5. 上清を捨て、75 % EtOH を 100 μL 入れ、30 秒静置 (洗い 1 回目)
6. 上清を捨て、75 % EtOH を 100 μL 入れ、30 秒静置 (洗い 2 回目)
7. 上清を捨て、EtOH を完全に除去し、5~10 分風乾
8. マグネットスタンドから外し、Low TE を 27 μL 加え、ピペッティングで混合
9. 室温 1 分静置
10. 再び、マグネットスタンドに置き、1 分静置
11. 上清 25 μL を新しい 96 well PCR plate に移す

<<Stop Point -30 ~ -10 °C で 1 ヶ月保存可、-80 °C で 6 ヶ月保存可>>

■ Amplicon Quantitation

1. Qubit の標準プロトコルに従い測定する
(Working Solution 199 μL + Sample 1 μL で測定)
2. 設定は「dsDNA High Sensitivity」

■ Amplicon dilution

1. PCR 産物の数に従い、カリキュレーターに入力する
2. Conc のセルに濃度を入れる
3. カリキュレーターに従って混合し、100 ng / 35 μL に調整する
4. 96 well PCR plate に調整済みのサンプルを分注する

<<Stop Point -30 ~ -10 °C で 1 ヶ月保存可、-80 °C で 6 ヶ月保存可>>

■ Amplicon Fragmentation

1. 以下のように 96 well PCR plate に試薬類を分注する

	1 sample	x ()
PCR amplicons (100ng)	35 μL	-----
Enzyme Mix II	9 μL	μL
10x Reaction Buffer	5 μL	μL
<hr/>		
Total	49 μL	14 μL ずつ分注

2. 軽くスピンドウンし、以下のプログラムでサーマルサイクラーにセットする

37 °C	6 min
<hr/>	
70 °C	10 min
<hr/>	
4 °C	∞

■ **Adaptor ligation and nick repair**

1. 以下のように Fragmentation 終了後の 96 well PCR plate に試薬類を分注する

	1 sample	x ()	
Fragmentation DNA	49 μ L	-----	
Ion Xpress Barcode	2 μ L	-----	
Ion Xpress P1 Adapter	2 μ L		μ L
10x Ligase Buffer*	10 μ L		μ L
dNTP Mix*	2 μ L		μ L
DNA Ligase*	2 μ L		μ L
Nick Repair Polymerase*	8 μ L		μ L
Nuclease-Free Water	25 μ L		μ L
Total	100 μL	49 μL 分注	

2. 軽くスピンドウンし、以下のプログラムでサーマルサイクラーにセットする

25 $^{\circ}$ C	15 min
72 $^{\circ}$ C	5 min
4 $^{\circ}$ C	∞

■ **Size-Selection**

1. AMPure XP Beads は、30 分以上室温に置いておく
 2. 75%エタノールを必要な分量のみ作成する。

	1 sample	x ()	
100 % EtOH	150 μ L		μ L
Nuclease-Free Water	50 μ L		μ L
Total	200 μL		

3. 1 枚目の Nunc 96 well Plate に以下の様に分注し、ピペッティングで混合する。

①Nunc 96 well plate

AMPure XP Beads	48.5 μ L
Ligated product	97.0 μ L
Total	145.5 μL

4. 室温 5 分→マグネットスタンドにセットし、3 分静置
 5. 2 枚目の Nunc 96 well Plate に以下の様に分注し、ピペッティングで混合する。

②Nunc 96 well plate

AMPure XP Beads	14.6 μ L
①Nunc 96 well plate の上清	130.0 μ L
Total	144.6 μL

6. 室温 5 分静置→マグネットスタンドにセットし、3 分静置
 7. 上清を捨て、75 % EtOH を 100 μ L 入れ、30 秒静置 (洗い 1 回目)
 8. 上清を捨て、75 % EtOH を 100 μ L 入れ、30 秒静置 (洗い 2 回目)
 9. 上清を捨て、EtOH を完全に除去し、5~10 分風乾
 10. マグネットスタンドから外し、Low TE を 27 μ L 加え、ピペッティングで混合
 11. 室温 1 分静置
 12. 再び、マグネットスタンドに置き、1 分静置
 13. 上清 25 μ L を新しい 96 well PCR plate に移す

<<Stop Point -30 ~ -10 $^{\circ}$ C で 1 ヶ月保存可、-80 $^{\circ}$ C で 6 ヶ月保存可>>

■ Secondary Amplification

1. 以下のように、サンプルが入っている 96 well PCR plate に試薬を分注する

		1 sample	x ()
Size-selected sample	25.0 μ L	-----	
Platinum PCR SuperMix High Fidelity	71.4 μ L		μ L
Library Amplification Primer Mix	3.6 μ L		μ L
Total	100.0 μL	75 μL	ずつ分注

2. 軽くスピンドウンし、以下のプログラムでサーマルサイクラーにセットする

95 $^{\circ}$ C	5 min	1 cycle
95 $^{\circ}$ C	15 sec	
58 $^{\circ}$ C	15 sec	8 cycles
70 $^{\circ}$ C	1 min	
4 $^{\circ}$ C	∞	1 cycle

■ Final Purification (グレー部分はダブルアンピュア)

1. AMPure XP Beads は、30 分以上室温に置いておく
2. 75%エタノールを必要な分量のみ作成する。

	1 sample	x ()
100 % EtOH	150 μ L	μ L
Nuclease-Free Water	50 μ L	μ L
Total	200 μL	

3. 以下の様に 96 well PCR plate に分注し、ピペッティングで混合する。

AMPure XP Beads	100 μ L
Amplified product	100 μ L
Total	200 μL

4. 室温 5 分静置→マグネットスタンドにセットし、3 分静置

5. 上清を完全に除去する

6. Low TE を 50 μ L 加え、ピペッティングで混合

7. 室温 1 分静置

8. 再び、マグネットスタンドに置き、1 分静置

9. 以下の様に新しい 96 well PCR plate に分注し、ピペッティングで混合する。

AMPure XP Beads	50 μ L
8 の上清	50 μ L
Total	100 μL

10. 上清を捨て、75 % EtOH を 100 μ L 入れ、30 秒静置 (洗い 1 回目)

11. 上清を捨て、75 % EtOH を 100 μ L 入れ、30 秒静置 (洗い 2 回目)

12. 上清を捨て、EtOH を完全に除去し、5~10 分風乾

13. マグネットスタンドから外し、Low TE を 27 μ L 加え、ピペッティングで混合

14. 室温 1 分静置

15. 再び、マグネットスタンドに置き、1 分静置

16. 上清 25 μ L を新しい 96 well PCR plate に移す

<<Stop Point -30 ~ -10 $^{\circ}$ C で 1 ヶ月保存可、-80 $^{\circ}$ C で 6 ヶ月保存可>>

■ Final quantification and library pooling

Qubit 3.0 Fluorometer にて dsDNA High Sensitivity の標準プロトコル通りに測定

詳細は英文マニュアルも参照下さい。

■ **Library pooling**

カリキュレーターに従い、混合及び希釈を行い、0.045 ng/μL に調整。

<<Stop Point -20 °Cで希釈前は2ヶ月、希釈後は2週間保存可>>

<< Ion Chef +S5>>

英文マニュアル参照

注意事項

●

株式会社ベリタス 〒105-0013 東京都港区浜松町 1-10-14 住友東新橋ビル 3号館 5階
TEL 03-5776-0078 FAX 03-5776-0076
技術的なお問い合わせは：TEL 03-5776-0040 E-mail techservice@veritastk.co.jp